



**Universidad**  
Zaragoza



## Trabajo Fin de Máster

# Obtención y caracterización de extractos ricos en proteína a partir de diferentes fuentes de proteína vegetal y de microalgas.

Autor

Óscar Gorrindo Osés

Directora: M<sup>a</sup> José Saiz Abajo

Ponente: Miriam Oliva Alcubierre

Departamento: Ingeniería Química y Tecnologías del Medio  
Ambiente

Universidad de Zaragoza

Año 2018



Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
**Universidad** Zaragoza



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y TÉCNICAS.....	7
3.1 Extracción de carbohidratos y desgrasado de muestras vegetales.....	7
3.2 Extracción de proteínas de muestras vegetales.....	10
3.2.1 Extracción de proteínas de torta tamizada de cáñamo.....	10
3.2.2 Extracción de C-ficocianina de microalga Spirulina.....	12
3.2.3 Extracción de proteínas de microalga Spirulina (sin ficocianina).....	13
3.3 Análisis de la pureza de los extractos proteicos obtenidos.....	15
3.4 Digestibilidad de muestras vegetales.....	17
3.5 Reactivos utilizados.....	19
3.6 Disoluciones preparadas.....	19
3.7 Instrumentación.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 Extracción de proteína de cáñamo.....	20
4.2 Extracción de proteína de microalga Spirulina.....	24
4.2.1 Extracción de proteína C-ficocianina.....	24
4.2.2 Extracción del resto de proteínas.....	25
4.3 Digestibilidad de muestra de microalga Spirulina.....	29
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

## RESUMEN

En este trabajo se presenta un método de obtención de extractos ricos en proteína, a partir de dos fuentes de proteína vegetal, como son la microalga *Espirulina* y un subproducto de cáñamo. Se estudió el rendimiento de extracción obtenido en cada caso, y se analizó el contenido en proteína (pureza) de los extractos mediante el método Kjeldhal. Además, se determinó el grado de digestibilidad de las proteínas de una muestra de la citada microalga, simulando el proceso de digestión que tiene lugar en el cuerpo de un ser humano, para comprobar el grado de absorción que tendrían en la dieta.

En el caso del subproducto de cáñamo, se trabajó a cuatro temperaturas distintas, con el objetivo de comprobar si dicha temperatura ejerce alguna influencia sobre los rendimientos de extracción y la pureza de los extractos, y de esta manera conseguir determinar las condiciones óptimas en las que llevar a cabo el proceso. Se concluyó que, efectivamente, existe influencia, obteniendo resultados distintos en función de la temperatura a la que aplicamos el método.

En el caso de la microalga *Espirulina*, se llevaron a cabo dos extracciones de proteínas. Primero se realizó una extracción de proteína C-ficocianina, cuyo interés se ha visto incrementado en los últimos tiempos debido a sus propiedades antioxidantes y terapéuticas; y a continuación del resto.

Los resultados obtenidos utilizando ambas fuentes de proteína vegetal han sido similares, lográndose rendimientos de extracción de alrededor del 60%, y alcanzándose purezas de más del 70%. En cuanto a la proteína C-ficocianina, tras llevar a cabo el proceso de extracción, pudo determinarse un contenido del 13% de la misma en la muestra de microalga *Espirulina* utilizada. Por último, al analizar la digestibilidad de las proteínas de dicha microalga, se obtuvieron resultados de en torno al 57% de proteína digerida, lo que concuerda con la bibliografía consultada.

## **ABSTRACT**

In this work, a method to obtain protein-rich extracts is presented, from two sources of vegetable protein, such as the *Spirulina* microalgae and a by-product of hemp. The extraction yield obtained in each case was studied, and the protein content (purity) of the extracts was analyzed by Kjeldhal method. In addition, the degree of digestibility of the proteins of a sample of the aforementioned microalga was determined, simulating the digestion process that takes place in the body of a human being, to verify the degree of absorption that they would have in the diet.

In the case of the hemp by-product, we worked at four different temperatures, in order to check whether said temperature exerts any influence on the extraction yields and the purity of the extracts, and in this way to determine the optimum conditions in which carry out the process. It was concluded that, in fact, there is the mentioned influence, obtaining different results depending on the temperature at which we apply the method.

In the case of *Spirulina* microalgae, two extractions of proteins were carried out. First, an extraction of phycocyanin protein was carried out, whose interest has been increased in recent times due to its antioxidant and therapeutic properties; and then the rest of proteins.

The results obtained using both vegetable protein sources have been similar, achieving extraction yields of around 60%, and reaching purities of more than 70%. Regarding the phycocyanin protein, after carrying out the process of its extraction, a content of 13% of it could be determined in the sample of microalgae *Spirulina* used. Finally, when analyzing the digestibility of the proteins of said microalga, results of around 57% of digested protein were obtained, which agrees with the consulted bibliography.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los suplementos proteicos, como los concentrados de proteína de suero o los aislados de suero de leche, han experimentado una creciente demanda en el mercado en los últimos años. Estos alimentos son consumidos, principalmente, con el objetivo de mejorar el rendimiento de los deportistas en su actividad física, o de contribuir a la recuperación del organismo tras el ejercicio físico<sup>1</sup>. Pero además, cabe destacar también la importancia del consumo de estos suplementos proteicos por parte de personas ancianas, que consiguen compensar la pérdida de masa muscular que experimentan debido a su avanzada edad, y mejorar su sistema inmunológico<sup>2</sup>.

Las proteínas de origen animal, como el suero de carne, y las de origen vegetal, como la soja, son las más utilizadas a día de hoy para obtener extractos enriquecidos en proteínas, que a continuación se añaden a la dieta como suplemento alimenticio<sup>3</sup>. Sin embargo, la obtención de dichas fuentes proteicas va acompañada en muchos casos de serios inconvenientes para el medio ambiente, como por ejemplo la degradación del suelo y el agotamiento de recursos hídricos (la producción de ganado requiere de un alto consumo de agua), afectando gravemente a la biodiversidad del ecosistema<sup>4</sup>.

Por otra parte, la población mundial sigue experimentando un constante aumento. Se espera que en 2050 dicha población mundial llegue a los 9,7 mil millones de personas, un 30% más que el actual escenario. Esta situación nos obliga a investigar nuevas estrategias de obtención de alimentos de manera sostenible, y que satisfaga la enorme demanda de proteínas que se generará. De ahí que el desarrollo de nuevas fuentes de proteína, y nuevos métodos de extracción de éstas, sea crucial en nuestra sociedad<sup>5</sup>.

Se busca que estas nuevas fuentes de proteína presenten propiedades tecnológicas y funcionales adecuadas para la industria alimentaria, y que puedan ser adquiridas a un precio razonable. En este sentido, las microalgas se han consolidado como una importante fuente de proteína vegetal, gracias a las ventajas que presentan en cuanto a su bajo coste de producción, su rápido crecimiento, y a sus beneficiosas cualidades nutritivas<sup>6</sup>.

Las proteínas que provienen de microalgas presentan un valor nutricional superior al de las proteínas convencionales utilizadas a día de hoy como suplemento alimenticio, debido fundamentalmente a su contenido proteico y a sus aminoácidos esenciales<sup>7</sup>.

La Espirulina es una microalga verde-azul conocida por su alto valor nutritivo y es considerada como una de las fuentes naturales más completas de vitaminas, minerales y otros nutrientes. Presenta un alto contenido de proteína en su biomasa (entre un 60 y un 70%), y recientemente se ha demostrado que la adición de concentrados o aislados proteicos de esta microalga a algunos alimentos puede ocasionar importantes beneficios para la salud. De ahí que la investigación de nuevos métodos de extracción de proteínas de la microalga Espirulina para obtener extractos proteicos concentrados haya adquirido un enorme interés en los últimos años<sup>8</sup>.

Una de las principales proteínas presentes en la composición de la Espirulina es la conocida como C-ficocianina. Se trata de una ficobiliproteína, es decir, un tipo de proteína coloreada

que participa en el proceso de captación de la luz durante la fotosíntesis de las algas. Estas macromoléculas son fluorescentes, solubles en agua y poseen colores variados e intensos. Según sus propiedades espectroscópicas, las ficobiliproteínas se dividen en cuatro grandes grupos<sup>9</sup>:

- Ficoeritrinas: con máximos de absorción entre 540-570 nm.
- Ficocianinas: cuyos máximos de absorción se encuentran entre 610-620 nm.
- Aloficocianinas: sus máximos de absorción están entre 650-655 nm.
- Ficoeritrocianinas: con máximos de absorción entre 570 y 595 nm.

Como se puede apreciar, los máximos de absorción de las ficobiliproteínas se encuentran en la región visible del espectro, al ser moléculas coloreadas. La masa molecular, la posición y la intensidad del máximo de absorción de estas macromoléculas dependen del estado de agregación, que se encuentra influenciado por parámetros tales como el pH de la disolución, la temperatura, la concentración de la proteína y el origen del alga de la que procede<sup>10</sup>.

La microalga *Espirulina* produce sólo dos tipos de ficobiliproteína, la C-ficocianina y la aloficocianina, ambas de color azul. La C-ficocianina es el principal pigmento proteico presente en las células de la *Espirulina*, mientras que la aloficocianina es un componente minoritario de ésta, presente sólo en el núcleo. Estas especies pueden ser utilizadas como pigmentos naturales, y como agentes antitumorales, antiinflamatorios y antioxidantes<sup>11</sup>.

Se ha estimado que la fracción proteica de la *Espirulina* puede llegar a contener hasta un 20% de C-ficocianina<sup>12</sup>. La utilización de este pigmento requiere de su extracción desde la biomasa de la microalga, y su posterior purificación. En general, el proceso de extracción de las ficobiliproteínas implica una ruptura celular y una posterior liberación de estas proteínas desde el interior de la célula, y, por lo tanto, es necesario el uso de variaciones en la presión osmótica, condiciones abrasivas, tratamientos químicos, congelación-descongelación y sonicación, entre otros<sup>13</sup>. Son varios los factores que influyen en la extracción de la C-ficocianina. Los más importantes son el método de ruptura celular, el tipo de disolvente, la relación de disolvente a biomasa y el tiempo de extracción empleado<sup>14</sup>. En nuestro estudio hemos empleado un método de extracción inorgánico para extraer la C-ficocianina de una muestra de microalga *Espirulina*.

Otro de los productos naturales que a día de hoy se está investigando como posible fuente de proteína vegetal es el cáñamo. El cáñamo (cáñamo industrial) es una variedad sin THC (el componente psicoactivo) de la planta *Cannabis sativa* L., que se cultiva con fines alimentarios e industriales, siendo su cultivo legal y estrictamente regulado. La planta *Cannabis sativa* L. ha sido durante miles de años una importante fuente de alimento, fibra, aceite y medicinas en Europa, Asia y África. A lo largo de la historia, las semillas de cáñamo han sido utilizadas como alimento, y su aceite ha sido consumido durante al menos 3000 años. Actualmente, a partir de las semillas de cáñamo se realizan diferentes productos alimenticios como bebidas vegetales y aceites<sup>15</sup>.

Las semillas de cáñamo poseen múltiples propiedades beneficiosas para el organismo. Contienen un 35% de aceite, con una composición de ácidos grasos interesante desde el punto de vista nutricional, además de un 20-30% de carbohidratos, un 10- 15% de fibra insoluble,

vitaminas y diferentes minerales. La mayor parte del aceite se extrae a través de un proceso de prensado en frío. Tras ello, la torta o harina de semilla restante, que contiene aproximadamente un 10% de aceite residual, tiene un alto contenido en proteína, generalmente entre el 30 y el 50%. Esta torta de semilla de cáñamo, una vez molida, se comercializa como fuente de proteína vegetal y de fibra dietética, en forma de polvo de proteína de cáñamo, harina de cáñamo, y en batidos. También se han elaborado diversos alimentos enriquecidos en semilla de cáñamo, como barritas energéticas y leche de cáñamo<sup>16</sup>.

La extracción de proteínas de la torta de semilla de cáñamo se suele llevar a cabo, generalmente, aplicando un pH alto, seguido de una precipitación en torno al punto isoelectrico de las proteínas en cuestión. Se ha demostrado que la funcionalidad, las propiedades físico-químicas y el valor nutricional de los aislados proteicos resultantes varían con respecto a la semilla de cáñamo inicial, antes de ser tratada. De ahí que sea importante comparar la calidad y las propiedades de ambos productos, antes y después de llevar a cabo el proceso de extracción de proteínas<sup>17</sup>. En este estudio, se llevó a cabo un método de desgrasado de una muestra de torta tamizada de cáñamo, y su posterior extracción de proteínas mediante un tratamiento básico y una precipitación en medio ácido, analizando posteriormente el contenido proteico del extracto obtenido.

Para poder utilizar los extractos proteicos obtenidos de diversas fuentes de proteína vegetal, como los comentados hasta ahora, como suplemento alimenticio y poder incorporarlos a la dieta, es crucial analizar su valor nutricional y el efecto que tendrían en el organismo de un ser humano. De nada sirve obtener un concentrado proteico vegetal, si la absorción de sus aminoácidos no es adecuada y sus proteínas difícilmente hidrolizables en el cuerpo humano. La calidad nutricional de un suplemento proteico depende de su composición en aminoácidos esenciales, la digestibilidad de sus proteínas y la utilización fisiológica de dichos aminoácidos específicos después de los procesos de digestión y absorción<sup>18</sup>.

El análisis de la digestibilidad de las proteínas es un factor importante para estimar la disponibilidad de dichas proteínas durante la absorción intestinal, tras la digestión, lo que refleja la eficiencia de su incorporación en la dieta. El ensayo de digestión in vitro de proteínas (IVPD) es un método ampliamente utilizado para determinar el parámetro de la digestibilidad. El método IVPD simula las condiciones alcanzadas durante los procesos digestivos que ocurren en el tracto gastrointestinal del ser humano, a través de la utilización de un sistema enzimático responsable de la degradación de las proteínas. Este sistema enzimático está formado por dos enzimas, pepsina y pancreatina, las cuales son liberadas por el estómago y páncreas respectivamente, y desempeñan un papel fundamental en la degradación de las proteínas durante el proceso de la digestión. Así pues, por este método (IVPD) se calcula el porcentaje de proteínas hidrolizadas por las citadas enzimas<sup>19</sup>.

En este trabajo se estudió la digestibilidad de una muestra de microalga *Espirulina*, utilizando para ello un simulante gástrico (compuesto por la enzima pepsina en medio ácido) y un simulante intestinal (formado por la enzima pancreatina en medio ligeramente básico), analizando finalmente el porcentaje de proteína de la muestra digerida con respecto a la inicial.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es la optimización del proceso de extracción de proteína a partir de dos matrices vegetales: la microalga *Espirulina* y un subproducto de cáñamo. Se desean obtener, a partir de ellas, extractos ricos en proteína y estudiar, por último, su digestibilidad mediante simulación de digestión *in vitro*.

Para optimizar dicho proceso se trabajará en diferentes condiciones de temperatura, tratando de conseguir aumentar todo lo posible el rendimiento de extracción y la pureza de las proteínas extraídas.

Utilizaremos el método Kjeldhal para analizar el contenido en proteína de los extractos proteicos obtenidos, y así poder determinar, por un lado, el rendimiento de extracción alcanzado, y por otro, el valor nutricional que estos extractos tendrían a la hora de ser incorporados en la dieta.

El estudio de la digestibilidad de las matrices vegetales utilizadas tiene el propósito de analizar el comportamiento que tendrían en el organismo de un ser humano al ser ingeridas, y comprobar el grado de absorción de sus nutrientes por parte de nuestro cuerpo.

El objetivo final de este trabajo de fin de máster será, en definitiva, estudiar la viabilidad de las citadas matrices vegetales como fuentes de proteína vegetal de uso alimentario y de alto interés nutricional.



### 3. MATERIALES Y TÉCNICAS

#### 3.1 Extracción de carbohidratos y desgrasado de muestras vegetales

La extracción de carbohidratos y el desgrasado son procesos que se llevan a cabo sobre muestras vegetales para eliminar los carbohidratos y las grasas que puedan contener en su composición, favoreciendo el posterior proceso de extracción de proteínas. Esta técnica ha sido aplicada sobre las dos muestras vegetales con las que hemos trabajado: microalga *Espirulina* y un subproducto (torta tamizada) de cáñamo.

La filosofía del método consiste en extraer los carbohidratos y grasas presentes en la muestra vegetal utilizando disolventes adecuados. Para la eliminación de carbohidratos se realiza una extracción sólido-líquido con etanol del 85%, y para la eliminación de las grasas presentes, tres extracciones consecutivas con hexano, eliminando en cada caso el sobrenadante (fase líquida), que es donde se encontrarán disueltas dichas sustancias. El sólido desgrasado obtenido se deposita en una bandeja bien extendido y se deja secar durante un día en campana.

En el caso del cáñamo, antes de aplicar el proceso de desgrasado, se parte de su semilla, y se somete a una etapa de prensado en frío, para extraer el aceite. A continuación, la torta de prensado se tritura mecánicamente para reducir el tamaño de partícula, obteniendo la torta tamizada de cáñamo, materia con la que trabajamos en el laboratorio. Es importante realizar además un tratamiento térmico sobre este subproducto de cáñamo, consistente en someter a la muestra a una temperatura de 90 °C durante 4 horas, con el objetivo de eliminar diversos antinutrientes que pudiera contener, y que podrían influir negativamente en el proceso posterior de extracción de proteínas.

Aunque la metodología del método es igual para ambas muestras vegetales, existen algunas diferencias que cabe destacar. En primer lugar, el volumen de disolvente necesario para llevar a cabo las extracciones será mayor en el caso de la *Espirulina*, debido a que se solubiliza peor y necesita una relación líquido/sólido más grande. Esto nos obliga a utilizar tubos de centrífuga (volumen de 250 mL), en lugar de tubos falcon como en el caso del cáñamo (volumen de 50 mL); y realizar la agitación en orbital, no en Geno Grinder. Además, resultará imprescindible triturar el alga suspendida en el líquido en cada extracción, empleando un ultra turrax, para poder solubilizarla adecuadamente, mientras que en el cáñamo no será necesario.

En las figuras 1 y 2 se representan de manera esquemática cada una de las etapas del proceso, para las dos matrices vegetales:

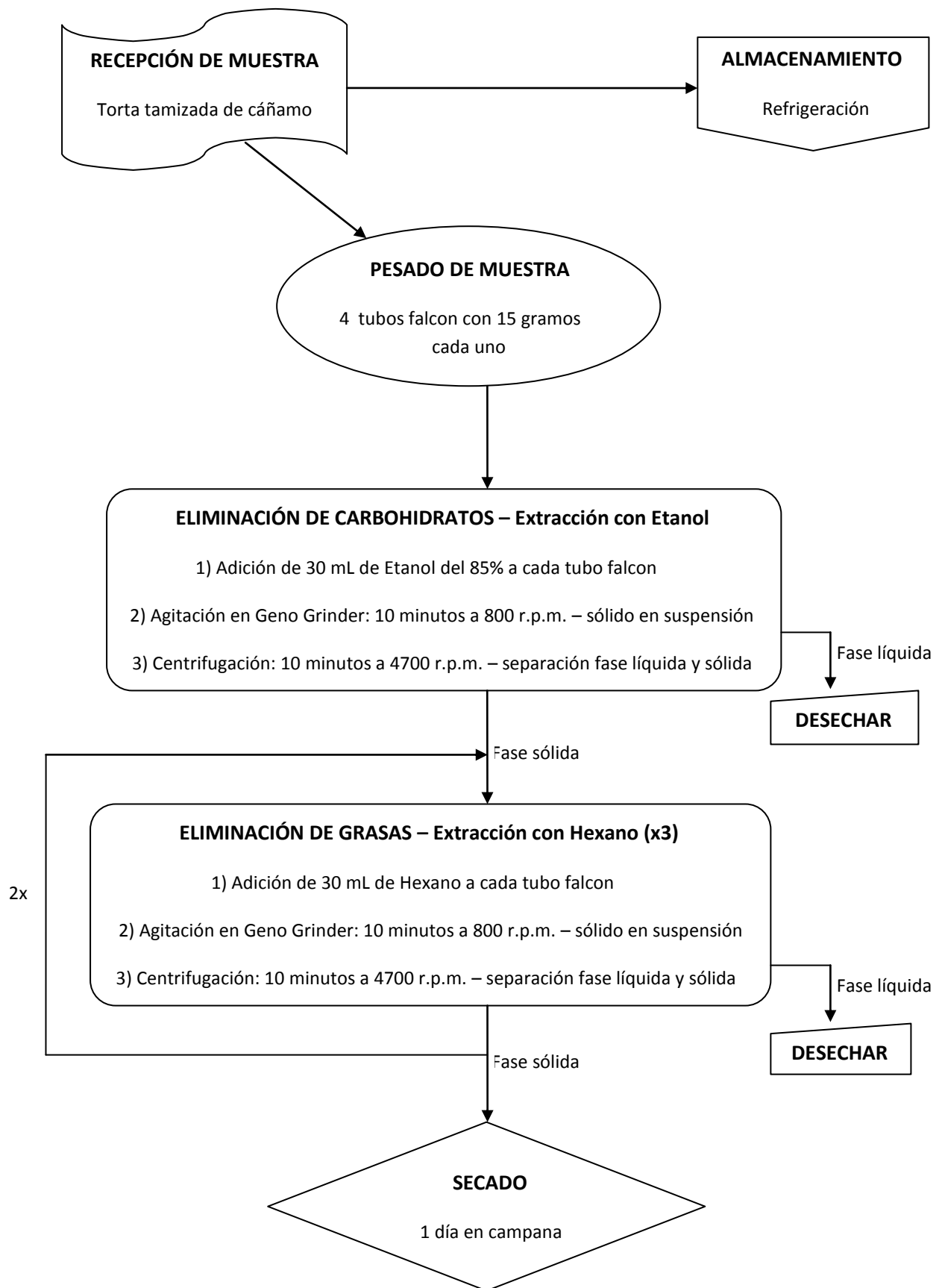


Fig. 1: Descripción del proceso de eliminación de carbohidratos y desgrasado de torta tamizada de cáñamo

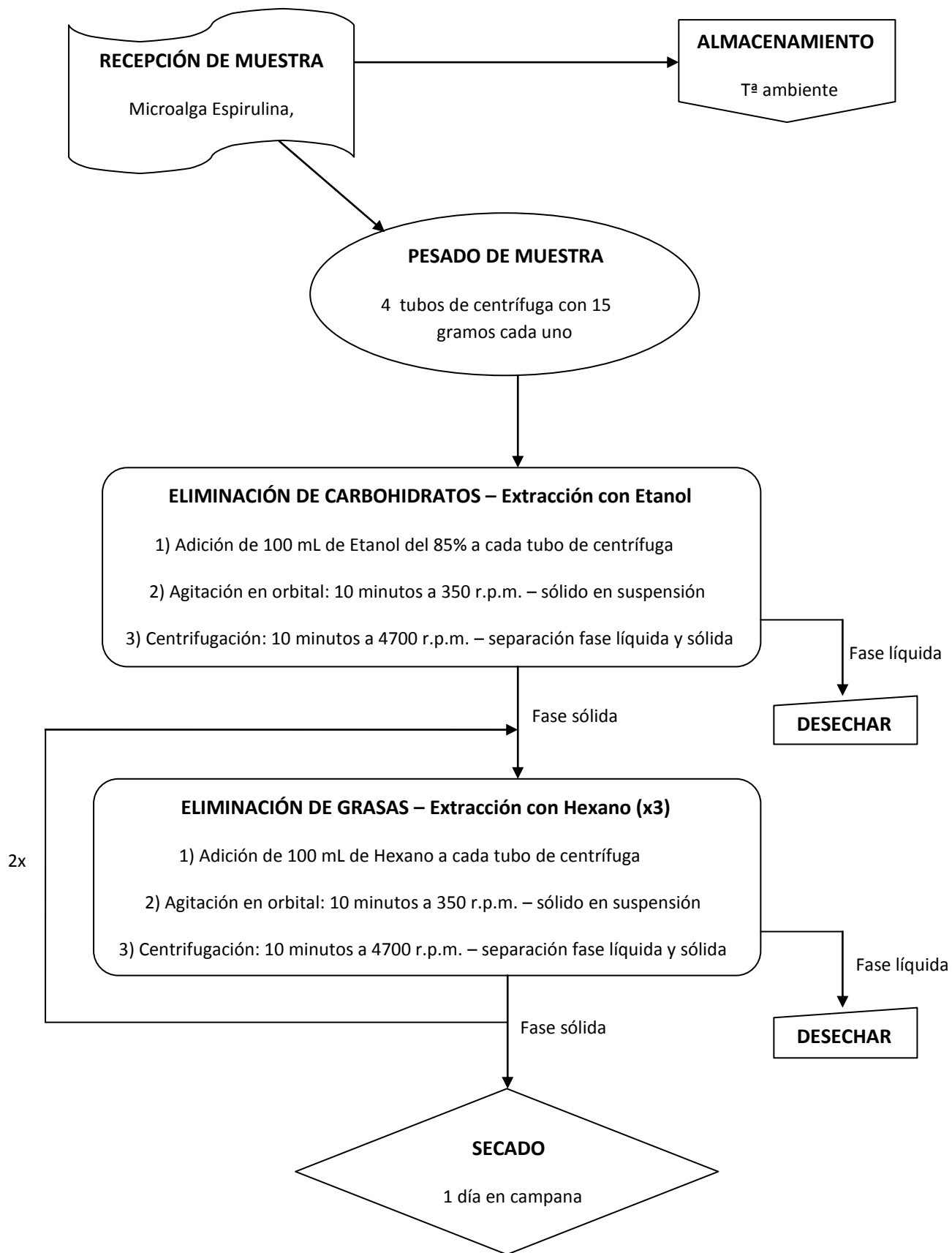


Fig. 2: Descripción del proceso de eliminación de carbohidratos y desgrasado de microalga Espirulina

## 3.2 Extracción de proteínas de muestras vegetales

### 3.2.1) Extracción de proteínas de torta tamizada de cáñamo

Este proceso tiene como objetivo extraer, con el máximo rendimiento alcanzable, las proteínas presentes en la muestra de torta tamizada de cáñamo, previamente desgrasada. Asimismo, se requiere que dichas proteínas extraídas sean de la máxima pureza posible, aumentando de esta manera su valor nutricional.

La filosofía del método se basa en solubilizar primero las proteínas de la muestra de cáñamo, para, a continuación, hacerlas precipitar alcanzando su punto isoelectrico. El punto isoelectrico de las proteínas es el pH para el cual el número de cargas positivas se iguala al de cargas negativas que aportan los grupos ionizables de sus aminoácidos, es decir, existe carga neta cero. En estas condiciones la solubilidad de las proteínas es casi nula y cristalizan en forma de sales insolubles.

Se llevan a cabo varias etapas, cada una de ellas con un fin determinado. Primero se realiza un tratamiento básico, consistente en añadir disolución de NaOH 1M a la muestra de cáñamo, alcanzando un pH mayor de 12, para solubilizar las proteínas presentes en ella. Tras una hora de agitación a una determinada temperatura (hemos trabajado a 80, 60, 40 y 25°C), se centrifuga la mezcla para separar las fases sólida y líquida. Nos interesa la fase líquida, que es dónde se encontrarán disueltas las proteínas. A continuación debemos precipitar dichas proteínas disueltas, para lo cual añadimos, gota a gota, disolución de HCl 1M hasta llegar al pH isoelectrico, en torno a pH=3,5. Llevamos a cabo una segunda centrifugación para separar la fase líquida, la cual deseamos, y la nueva fase sólida que se nos ha formado (proteínas precipitadas). Finalmente, se realiza una etapa de secado del sólido en estufa, a 40°C durante un día.

Con el objetivo de aumentar al máximo el rendimiento de extracción, realizaremos el proceso anteriormente descrito tres veces, de tal manera que obtengamos 3 extractos proteicos, los cuales juntaremos una vez secos. Es por ello que, sobre el sólido obtenido en la primera centrifugación, se vuelve a realizar otra vez el tratamiento básico comentado antes, para solubilizar las proteínas que pueda tener todavía, precipitándolas a posteriori. Y así un total de tres veces. Naturalmente, la cantidad de proteína que obtenemos va siendo menor en cada extracción consecutiva.

En la figura 3 se representan, de manera esquemática, cada una de las etapas del proceso descrito:

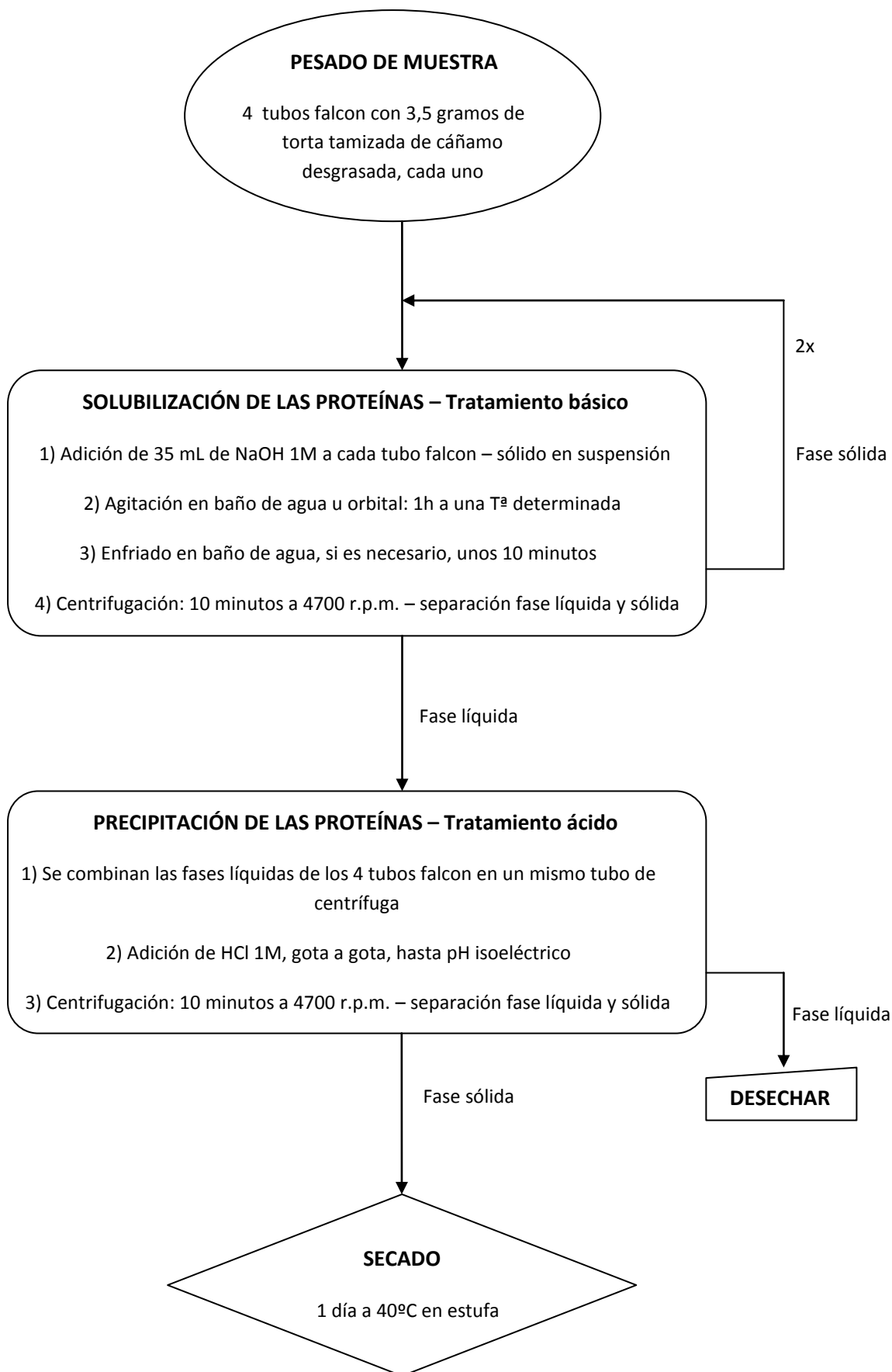


Fig. 3: Descripción del proceso de extracción de proteína de torta tamizada de cáñamo

### 3.2.2) Extracción de C-ficocianina de microalga Espirulina

El método empleado para llevar a cabo este proceso ha consistido en una extracción inorgánica utilizando tampón fosfato de sodio. Se añadió un volumen de dicho tampón a la muestra de alga, y durante 16 horas se tuvo en agitación orbital. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó y se midió la absorbancia del sobrenadante a diferentes longitudes de onda (652 nm, 650 nm, 620 nm, 615 nm, 562 nm y 280 nm) mediante espectrometría de absorción UV-Vis, lo que nos permite calcular el porcentaje de C-ficocianina extraído. Fue necesario aplicar una dilución 1/500 al sobrenadante para poder realizar la medida, ya que con diluciones menores se obtenían valores de absorbancia mayores que uno.

Por otra parte, el sólido obtenido (Espirulina sin ficocianina) se secó durante un día en campana, para poder realizar sobre él los procesos de desgrasado y extracción del resto de sus proteínas. En la figura 4 se pueden observar las diferentes etapas del proceso:

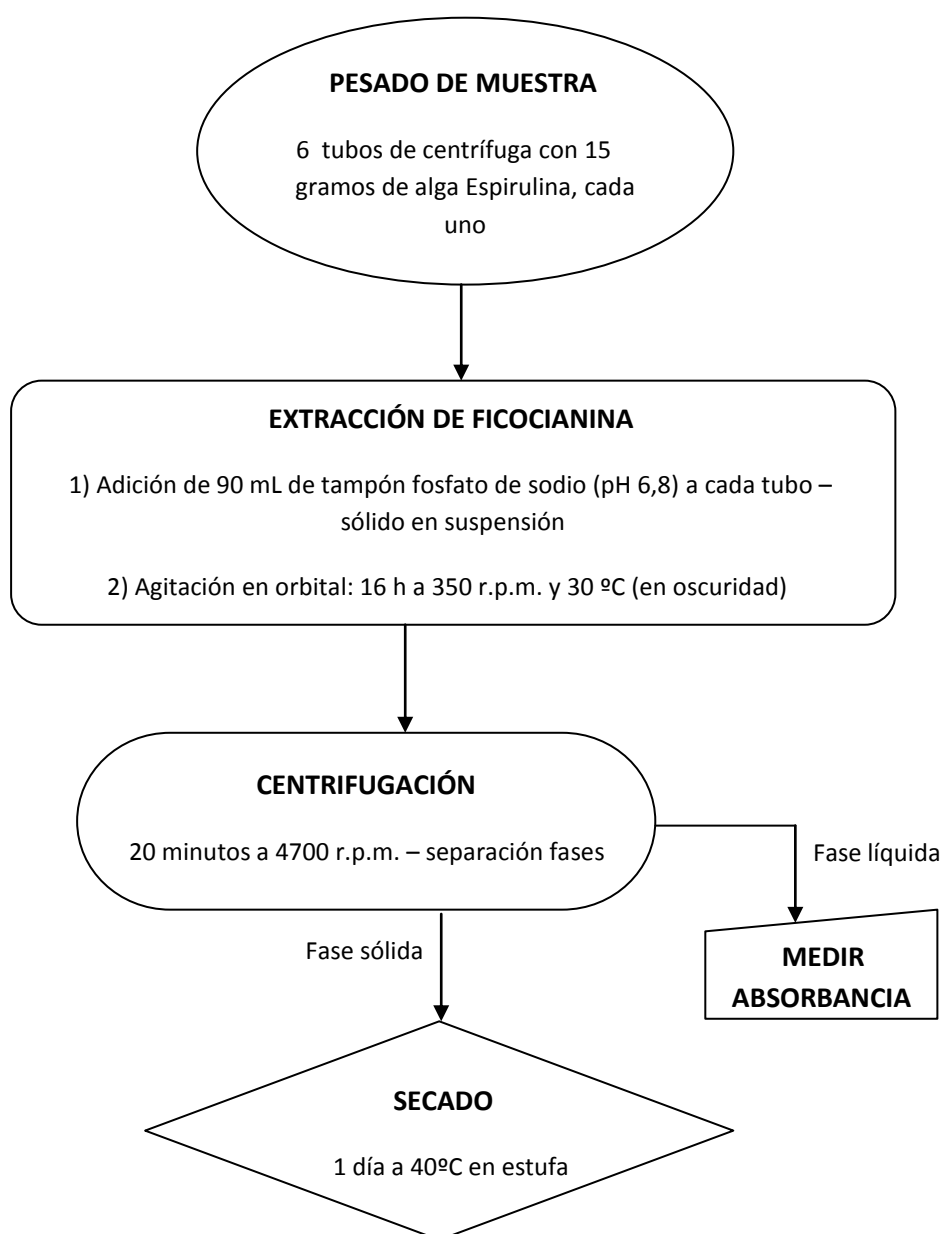


Fig. 4: Descripción del proceso de extracción de proteína C-ficocianina de microalga Espirulina

### 3.2.3) Extracción de proteínas de microalga *Espirulina* (sin ficocianina)

Como se ha comentado con anterioridad, la microalga *Espirulina* tiene un porcentaje de proteína de entre un 60 – 70 %, lo que le confiere un alto interés nutricional. Con este método se pretenden obtener extractos proteicos concentrados de esta microalga, maximizando el rendimiento de extracción y pureza de los mismos.

El procedimiento presenta semejanzas con el de extracción de proteína del cáñamo, en cuanto a que está basado en solubilizar primero las proteínas de la muestra, para después hacerlas precipitar alcanzando su punto isoelectrico. Se diferencia principalmente en la relación sólido/líquido empleada y la frecuencia de centrifugación necesaria para separar las fases que se formen. El método se aplica sobre muestras de microalga *Espirulina*, previamente desgrasada, y tras haber llevado a cabo la extracción de la proteína C-ficocianina.

Para realizar, en primer lugar, la solubilización de las proteínas presentes, se disuelven 0,5 gramos de muestra en 10 mL de agua destilada, empleando un ultra turrax, a 9000 r.p.m. durante 1 minuto, para conseguir homogeneizar la mezcla. Esta emulsión se somete a continuación a un tratamiento de ultrasonidos durante 20 minutos, con una frecuencia de 20KHz, en ciclos de 2 min. ON/1 min. OFF. La microalga *Espirulina* presenta serias dificultades a la hora de solubilizarla en agua, de ahí que sea imprescindible utilizar el ultra turrax y la técnica de ultrasonidos para llevar a cabo este proceso.

Seguidamente se ajusta la mezcla a un pH alcalino, añadiendo disolución de NaOH 1M, gota a gota, hasta pH 11. Es entonces cuando se procede a la primera centrifugación, en unas condiciones de 15200 g de frecuencia durante 30 minutos, para separar las fases líquida y sólida. Sobre la fase sólida se vuelven a realizar los pasos anteriores dos veces más, aumentando de esta manera el rendimiento de extracción. Nos interesa la fase líquida (sobrenadante), en la cual se encontrarán disueltas las proteínas.

Posteriormente se lleva a cabo la precipitación de las proteínas presentes en dicha fase líquida alcanzando el punto isoelectrico. Para ello se añade, en este caso, disolución de HCl 1M gota a gota, hasta alcanzar un pH de 4,2. Finalmente se centrifuga la mezcla, con el objeto de separar la fracción sólida, que será el extracto proteico que habremos conseguido extraer de la muestra de microalga inicial. Para secar dicho extracto sólido, se congela a una temperatura de -80°C durante 24 horas y se liofiliza al día siguiente.

La liofilización es un método de secado muy efectivo, consistente en congelar la cantidad de agua que contenga el extracto sólido, para después sublimarla, pasando directamente del estado sólido al gaseoso. Con ello se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el sólido, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

En la figura 5 se representan, de manera esquemática, cada una de las etapas del proceso descrito:

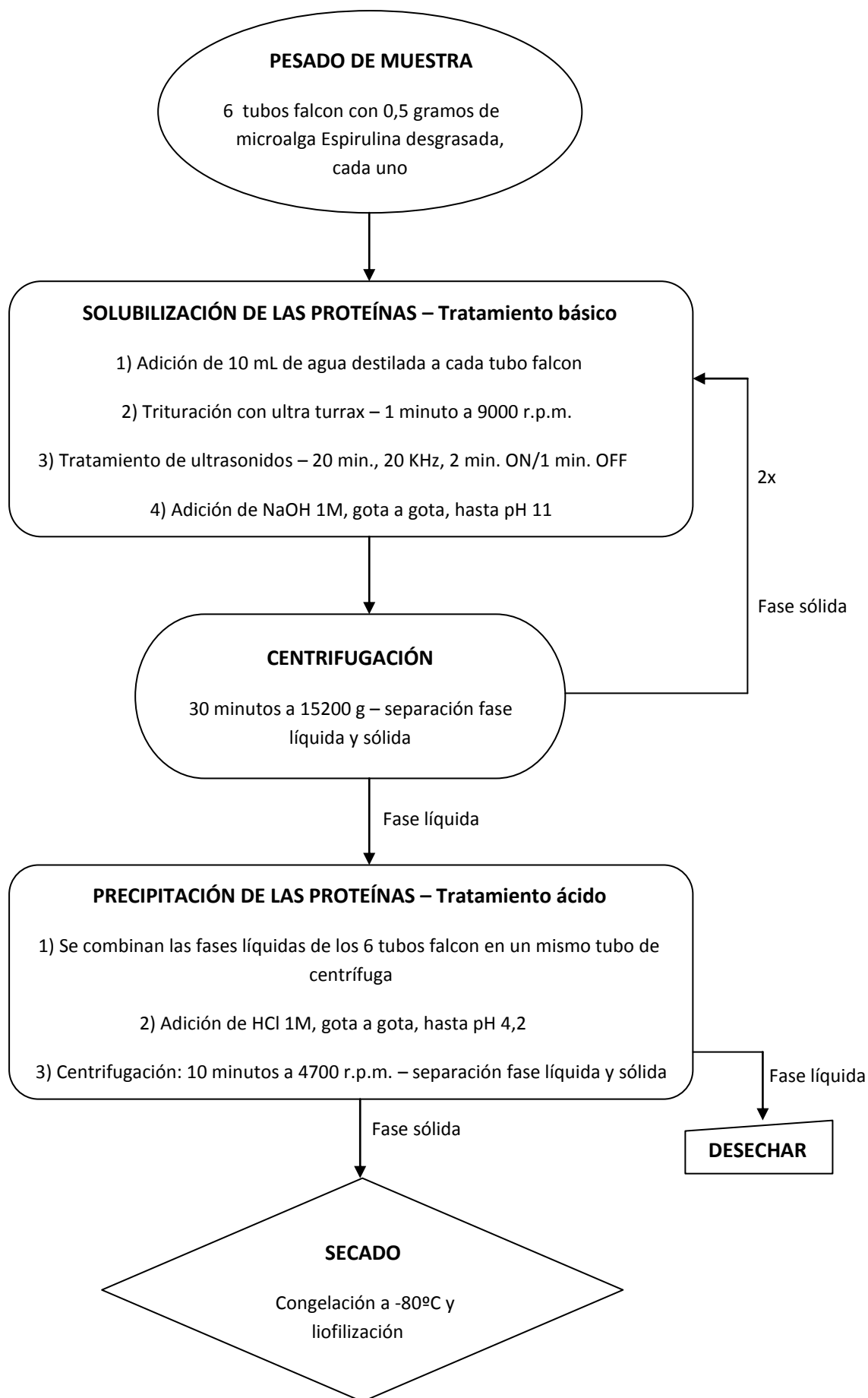


Fig. 5: Descripción del proceso de extracción de proteínas de microalga Spirulina



### 3.3 Análisis de la pureza de los extractos proteicos obtenidos

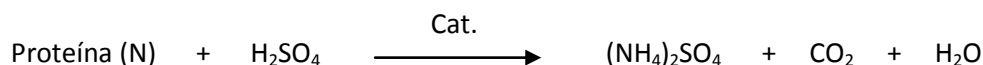
Para determinar el contenido en nitrógeno de los extractos proteicos obtenidos a partir de muestras de cáñamo y microalga *Espirulina* utilizamos el método Kjeldhal. Este ensayo está basado principalmente en tres etapas, que se resumen en una digestión ácida del alimento, una destilación del amoniaco formado, y una valoración ácido-base. Si lo que queremos es saber la cantidad de proteína en la muestra, debemos multiplicar el contenido de nitrógeno calculado por un factor empírico, cuyo valor es 6,25. Este factor se ha calculado considerando el contenido medio de nitrógeno (16%) en las proteínas de diversos alimentos:

$$\text{Factor: } \frac{100}{16} = 6,25 \quad \longrightarrow \quad \text{Proteína} = (N \cdot 6,25)$$

#### ➤ Etapas:

##### 1. Digestión ácida

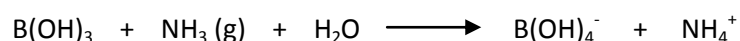
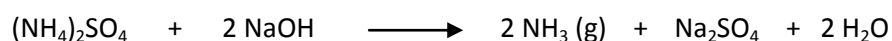
El objetivo del procedimiento de digestión es romper todos los enlaces del nitrógeno de la muestra y convertirlo en iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) mediante un tratamiento ácido a alta temperatura. El carbono y el hidrógeno se transforman en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  respectivamente. Para ello, se pesa la muestra y se mezcla con ácido sulfúrico concentrado a una temperatura de  $410^\circ\text{C}$  durante 45 minutos, utilizando sulfato de cobre y sulfato de potasio como catalizadores de la reacción.



Una vez finalizada la digestión, se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se diluye con agua y se envía a la unidad de destilación.

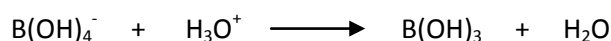
##### 2. Destilación

Durante la destilación, los iones amonio se transforman en amoniaco tras añadir disolución de sosa ( $\text{NaOH}$ ). Este amoniaco (gaseoso) formado se destila siendo arrastrado por medio de una corriente de vapor de agua, y se recoge en un vaso receptor sobre una disolución de ácido bórico al 1%, que contiene además indicador rojo de metilo para la valoración posterior.



##### 3. Valoración

La última etapa del proceso consiste en una valoración ácido-base de los iones tetrahidroxiborato ( $\text{B(OH)}_4^-$ ) frente a una disolución estandarizada de ácido clorhídrico 0,1 M. De esta manera, a través del punto de equivalencia de la reacción, podemos conocer la cantidad de nitrógeno presente en la muestra inicial.



Moles de HCl añadidos = moles de  $\text{NH}_3$  = moles de N en la muestra

Paralelamente a la muestra problema, se realizará el proceso completo descrito sobre disolución de blanco, como en todo método analítico. Cabe destacar además que, tanto la digestión de la muestra como la posterior destilación y valoración, se realizan de manera automática, con equipos diseñados para tal fin.



Ilustración 1: Equipo automático para la digestión



Ilustración 2: Equipo automático para la destilación y valoración

#### ➤ Cálculo de resultados

El cálculo se realiza según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \cdot F \cdot N \cdot 14}{1000 \cdot P} \cdot 100$$

Siendo:

V: Volumen en mL de HCl 0,1 N consumidos en la valoración. A los mL de HCl gastados en la valoración de la muestra problema hay que restarle los mL de HCl consumidos en la valoración del blanco.

F: Factor aceptado en el certificado del ácido clorhídrico.

N: Normalidad exacta del HCl utilizado en la valoración.

P: Peso en gramos de muestra.

14: Peso atómico del nitrógeno.

1000: Factor de conversión de miliequivalentes a equivalentes.

El resultado puede expresarse, por tanto, en gramos de N/100 gramos de muestra, o en gramos de proteína/100 gramos de muestra, al multiplicar por su correspondiente factor de conversión [(g de N/100 g de muestra) \* 6,25].

### 3.4 Digestibilidad de muestras vegetales

Con este método se pretende determinar la digestibilidad *in vitro* de las proteínas procedentes de muestras vegetales. Es aplicable a alimentos ricos en proteína desgrasados, y en nuestro caso lo utilizaremos sobre una muestra de microalga *Espirulina* desgrasada.

Este ensayo nos permite estudiar la eficiencia en la incorporación de las proteínas a la dieta, una vez ingeridas, estimando el grado de disponibilidad de dichas proteínas durante la absorción intestinal tras la digestión. Es decir, lo utilizaremos para analizar cómo se comportarían los alimentos en cuestión en el organismo de un ser humano, y en qué grado se lograrían absorber las proteínas presentes durante la digestión.

La determinación se basa en someter a los alimentos estudiados a una simulación del proceso de digestión enzimática que experimentarían en el interior del cuerpo de un ser humano. Para ello la muestra se digiere en un simulante gástrico (pH ácido y pepsina) e intestinal (pH ligeramente básico y pancreatina) y a continuación se analiza su contenido proteico mediante la determinación del nitrógeno soluble a través del ensayo Kjeldhal. Dicho de otra manera, se determina el contenido de nitrógeno (proteína) que conserva la muestra una vez ha sido digerida, y ese resultado nos indica el grado de absorción que dichas proteínas experimentarían en nuestro cuerpo durante el proceso de la digestión. La pepsina y la pancreatina son dos enzimas liberadas por el estómago y páncreas respectivamente. Tienen un papel fundamental en la degradación de las proteínas, de ahí que las utilicemos en nuestro estudio.

El simulante gástrico (SG) se prepara disolviendo una pequeña cantidad de pepsina en disolución de HCl 0,1 M; mientras que para el simulante intestinal (SI) se disuelve la enzima pancreatina en disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M (pH 8). Estas disoluciones enzimáticas deben ser preparadas el mismo día de su uso. Además, es necesario preparar también un blanco junto con las muestras, para eliminar las interferencias derivadas del contenido en nitrógeno de las propias enzimas. El blanco consiste en pesar una cantidad equivalente a la de muestra, pero de agua destilada, sometiéndola después al mismo proceso de digestión.

El proceso se inicia con una simulación de digestión gástrica. Para ello, se añade un volumen de simulante gástrico sobre la cantidad de muestra pesada, y sobre el agua desionizada en el caso del blanco. Tras agitación en vórtex, se incuba durante 3 horas a 37°C en agitación orbital. Transcurrida esta incubación, se lleva a cabo una simulación de digestión intestinal. En este caso, se adicionan volúmenes de tres sustancias distintas: primero disolución de NaOH 0,5 N para neutralizar la reacción anterior, después el simulante intestinal, y por último un pequeño volumen de azida de sodio para impedir el crecimiento microbiano. Nuevamente se realiza una incubación a 37°C, en esta ocasión durante 24 horas. Finalmente, pasado ese tiempo, se añade ácido tricloroacético y se centrifugan las muestras a 503 g durante 20 minutos, analizando después el contenido en nitrógeno de los sobrenadantes mediante el método Kjeldhal.

En la figura 6 se representan, de manera esquemática, cada una de las etapas del proceso descrito:

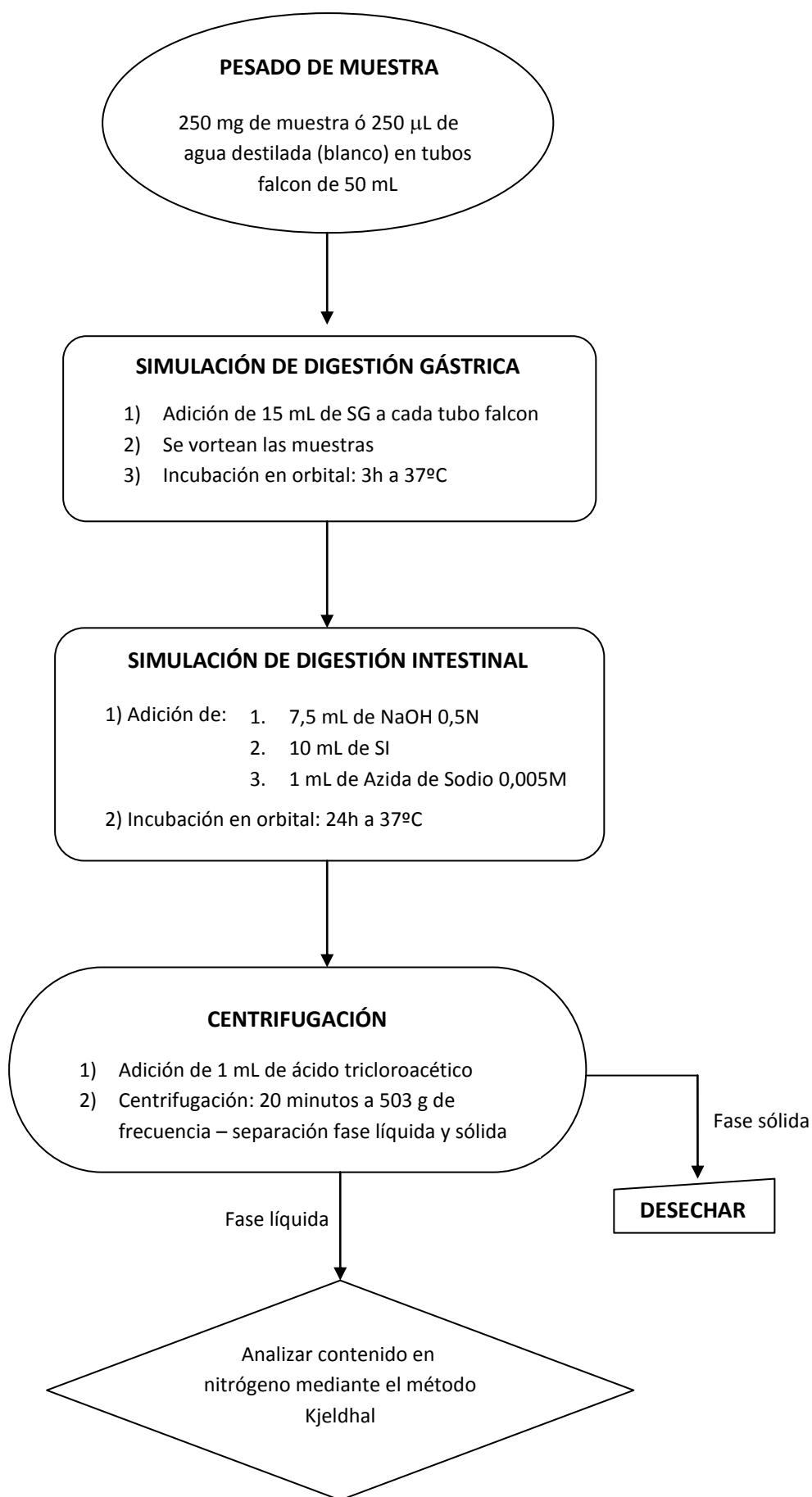


Fig. 6: Descripción del proceso de digestibilidad de muestras vegetales

### 3.5 Reactivos utilizados

Etanol concentrado (Panreac AppliChem,  $C_2H_5OH$ ). Hexano-mezcla de alcanos (Panreac AppliChem,  $C_6H_{14}$ ). Hidróxido de sodio lentejas (Panreac AppliChem, NaOH). Ácido clorhídrico 37% (Emsure, HCl). Dihidrogenofosfato de sodio monohidrato (Emsure,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ). Hidrogenofosfato de sodio heptahidrato (Emsure,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ). Pepsina (Panreac AppliChem). Pancreatina (Panreac AppliChem). Dihidrogenofosfato de potasio (Emsure,  $KH_2PO_4$ ). Hidrogenofosfato de potasio (Emsure,  $K_2HPO_4$ ). Azida de sodio (Sigma-Aldrich,  $NaN_3$ ). Ácido tricloroacético (Panreac,  $CCl_3COOH$ ). Ácido sulfúrico concentrado (Emsure,  $H_2SO_4$ ). Sulfato de cobre (Panreac,  $CuSO_4$ ). Sulfato de potasio (Panreac,  $K_2SO_4$ ). Ácido bórico (Sigma-Aldrich,  $H_3BO_3$ ).

### 3.6 Disoluciones preparadas

Con los reactivos descritos se prepararon las siguientes disoluciones: Disolución de etanol al 85%. Disolución de NaOH 1M. Disolución de NaOH 0,5M. Disolución de HCl 1M. Disolución de HCl 0,1M. Tampón fosfato de sodio 0,1M; pH=6,8. Disolución de simulante gástrico (SG) de 1,5 mg de pepsina/mL. Disolución de simulante intestinal (SI) de 1 mg de pancreatina/mL. Tampón fosfato de potasio 0,2M; pH=8. Disolución de azida de sodio 0,005M. Disolución de ácido tricloroacético de 100g/L. Disolución de ácido bórico al 1%. Disolución alcohólica de rojo de metilo al 0,1%.

### 3.7 Instrumentación

- **Geno Grinder:** SPEX Sample Prep
- **Centrífuga de laboratorio:** JP Selecta
- **Estufa de laboratorio:** Memmert
- **Baño de agua:** Memmert
- **Orbital incubador:** Edmund Bühler (EB)
- **Liofilizador:** Telstar, LyoAlpha
- **Espectrofotómetro de Absorción UV-Vis:** Perkin Elmer, Lambda Bio40
- **Ultra turrax:** IKA
- **Cuerno sonicador:** Branson 102C
- **Equipo de digestión:** JP Selecta
- **Equipo de destilación:** JP Selecta
- **pH-metro:** Crison

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Extracción de proteína de cáñamo

Se realizaron pruebas a cuatro temperaturas de solubilización distintas, para comprobar si existe algún tipo de influencia en el rendimiento y pureza de las proteínas extraídas. Para cada una de las temperaturas empleadas se realizó el proceso dos veces, trabajando con tres o cuatro réplicas en cada ocasión.

En cada caso se calculó la cantidad de proteína que teóricamente contenía la muestra pesada inicialmente (35% en el caso del cáñamo); y al finalizar el proceso, se pesó el extracto proteico obtenido, se analizó su pureza (porcentaje de proteína del mismo), y se calculó en último lugar el rendimiento de extracción de proteína logrado.

Cálculos realizados:

- Proteína teórica (g) = Peso total inicial de muestra (g) \* 0,35
- Pureza (%) = Porcentaje de proteína en el extracto obtenido, calculado utilizando el método Kjeldhal.
- Rendimiento de extracción (%) =  $\left( \frac{\text{Peso extracto (g)} * \frac{\text{Pureza (\%)}}{100}}{\text{Proteína teórica (g)}} \right) * 100$

Los resultados obtenidos para cada una de las temperaturas empleadas se muestran en las tablas 1 a 8:

➤ A 80°C

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5418	35	13,3879	4,6858	pH 3,5	3,3212	49,00	34,73
1.2	3,5246	35						
1.3	3,5085	35						
1.4	2,8130	28						

Tabla 1: Resultados proceso extracción de proteína a 80°C (primera vez)

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5307	35	10,5486	3,6920	pH 3,5	3,4474	33,00	30,81
1.2	3,5132	35						
1.3	3,5047	35						

Tabla 2: Resultados proceso extracción de proteína a 80°C (segunda vez)

➤ A 60°C

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5079	35	14,0555	4,9194	ph 3,5	3,2494	61,00	40,29
1.2	3,5244	35						
1.3	3,5028	35						
1.4	3,5204	35						

Tabla 3: Resultados proceso extracción de proteína a 60°C (primera vez)

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5098	35	14,0361	4,9126	ph 3,5	3,7398	64,00	48,72
1.2	3,5093	35						
1.3	3,5068	35						
1.4	3,5102	35						

Tabla 4: Resultados proceso extracción de proteína a 60°C (segunda vez)

➤ A 40°C

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5059	35	14,0541	4,9189	ph 3,5	3,7463	70,00	53,31
1.2	3,5294	35						
1.3	3,5118	35						
1.4	3,5070	35						

Tabla 5: Resultados proceso extracción de proteína a 40°C (primera vez)

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5221	35	10,7753	3,7714	ph 3,5	3,3033	67,00	58,68
1.2	3,6711	35						
1.3	3,5821	35						

Tabla 6: Resultados proceso extracción de proteína a 40°C (segunda vez)

➤ A 25°C

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5088	35	14,0652	4,9228	ph 3,5	3,9080	72,00	57,16
1.2	3,5132	35						
1.3	3,5226	35						
1.4	3,5206	35						

Tabla 7: Resultados proceso extracción de proteína a 25°C (primera vez)

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen NaOH (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 35%		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	3,5256	35	14,0961	4,9336	pH 3,5	4,0865	77,00	63,78
1.2	3,5297	35						
1.3	3,5384	35						
1.4	3,5024	35						

**Tabla 8: Resultados proceso extracción de proteína a 25°C (segunda vez)**

➤ Tratamiento de los resultados:

Los resultados obtenidos han sido tratados estadísticamente, como se puede ver en las tablas 9 y 10, y comparados entre sí mediante una herramienta de análisis de varianza. En base a ello, se han extraído las conclusiones pertinentes.

Temperaturas	Rendimiento de extracción %				
	1	2	Promedio	Desvest	CV
80 °C	34,73	30,81	<b>32,77</b>	2,77	8,45
60 °C	40,29	48,72	<b>44,51</b>	5,96	13,39
40 °C	53,31	58,68	<b>56,00</b>	3,80	6,78
25 °C	57,16	63,78	<b>60,47</b>	4,68	7,74

**Tabla 9: Resultados de rendimientos de extracción obtenidos**

Temperaturas	Pureza %				
	1	2	Promedio	Desvest	CV
80 °C	49,00	33,00	<b>41,00</b>	11,31	27,59
60 °C	61,00	64,00	<b>62,50</b>	2,12	3,39
40 °C	70,00	67,00	<b>68,50</b>	2,12	3,10
25 °C	72,00	77,00	<b>74,50</b>	3,54	4,75

**Tabla 10: Resultados de pureza de los extractos obtenidos**

Para comparar estadísticamente los resultados obtenidos, hemos utilizado la herramienta ANOVA, la cual nos permitirá saber si existen diferencias significativas en los valores de pureza y rendimiento de extracción para las cuatro temperaturas empleadas. Esta información queda reflejada en las figuras 7 y 8:



ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	925,5322738	3	308,5107579	15,5143	0,0114	6,5914
Dentro de los grupos	79,54229368	4	19,88557342			
Total	1005,074567	7				

Fig. 7: Test Anova aplicado a los resultados de rendimiento de extracción obtenidos

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1278,375	3	426,125	11,4013	0,0198	6,5914
Dentro de los grupos	149,5	4	37,375			
Total	1427,875	7				

Fig. 8: Test Anova aplicado a los resultados de pureza de los extractos obtenidos

Los resultados proporcionados por ANOVA nos indican un valor de F experimental mayor que el valor de F crítico en ambos casos, lo que nos permite concluir que, efectivamente, **existen diferencias significativas en los resultados obtenidos para las diferentes temperaturas**. Por lo tanto, podemos concluir que, la temperatura a la que llevamos a cabo el proceso de extracción de proteínas, influye en el rendimiento de extracción y en la pureza de las proteínas obtenidas.

## 4.2 Extracción de proteínas de microalga Espirulina

Como ya se mencionó anteriormente, sobre la muestra de Espirulina hemos realizado dos tipos de extracciones. Primero se realizó una extracción de la proteína ficocianina presente en la composición de la muestra, y, en segundo lugar, del resto. Ambos resultados se han tratado por separado. En el primer caso se pretende saber qué porcentaje de ficocianina contiene la muestra de microalga inicial; y en el segundo caso, se desea obtener un extracto rico en proteína de la máxima pureza posible.

### 4.2.1) Extracción de proteína C-ficocianina

Se midió la absorbancia de los sobrenadantes tras la centrifugación, para cada una de las seis réplicas, por espectrometría de absorción UV-Vis, a seis longitudes de onda distintas (652 nm, 650 nm, 620 nm, 615 nm, 562 nm y 280 nm). Para poder llevar a cabo la medida en el espectrofotómetro, fue necesario realizar una dilución 1/500 con tampón fosfato de sodio, ya que con diluciones menores se obtenían valores de absorbancia mayores que uno. En la siguiente tabla se pueden ver los resultados obtenidos:

ID	Peso (g)	Volumen final (mL)	Dilución	Abs 652 (nm)	Abs 650 (nm)	Abs 620 (nm)	Abs 615 (nm)	Abs 562 (nm)	Abs 280 (nm)
1.1	14,5665	90	500	0,1563	0,1603	0,2955	0,2916	0,1809	0,6197
1.2	14,3893	90	500	0,1493	0,1532	0,2854	0,2817	0,1736	0,6005
1.3	14,9633	90	500	0,1637	0,1673	0,3084	0,3041	0,1886	0,6583
1.4	15,4076	90	500	0,1825	0,1861	0,3412	0,3362	0,2089	0,7375
1.5	15,0868	90	500	0,1662	0,1697	0,3144	0,3099	0,1911	0,6790
1.6	14,9646	90	500	0,1771	0,1808	0,3326	0,3277	0,2032	0,7136

Tabla 11: Valores de absorbancia obtenidos para cada alícuota

Para calcular la cantidad de proteína C-ficocianina (PC) extraída de la muestra de microalga Espirulina, tomaremos como referencia los valores de absorbancia a 615 y a 652 nm, que corresponden con los máximos de absorbancia de las especies C-ficocianina y Aloficocianina, respectivamente. Ambas especies constituyen los dos tipos de ficobiliproteína presentes en la composición de la Espirulina. Las fórmulas utilizadas se detallan a continuación:

$$\text{Concentración PC (mg/mL)} = \frac{\text{Abs}(615 \text{ nm}) - 0,474 (\text{Abs}(652 \text{ nm}))}{5,34} * \text{dilución}$$

$$\text{Concentración PC (mg/g de muestra)} = \text{Concentración (mg/mL)} * \frac{\text{Volumen final (mL)}}{\text{Peso inicial muestra (g)}}$$

$$\text{Porcentaje PC (\%)} = \text{Concentración (mg/g de muestra)} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} * 100\text{g de muestra}$$

En base a ellas, hemos obtenido los siguientes resultados, que se muestran en la tabla 12:

	Concentración de C-ficocianina en alícuota (mg/mL)	Concentración de C-ficocianina en muestra (mg/g)
1.1	20,37	125,84
1.2	19,75	123,53
1.3	21,21	127,56
1.4	23,38	136,57
1.5	21,64	129,10
1.6	22,82	137,26
Promedio	21,53	129,98
Desvest	1,40	5,69
CV	6,48	4,38

Tabla 12: Resultados de concentración de C-ficocianina obtenidos

Hemos obtenido una concentración media de 129,98 mg de ficocianina por gramo de muestra, que expresado en tanto por cien serían:

$$\text{Porcentaje (\%)} = 129,98 \text{ mg/g} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} * 100 \text{ g de muestra} = \mathbf{13,00 \text{ g de FC/100 g de muestra}}$$

Con estos resultados concluimos que, de todo el contenido proteico de la muestra de alga *Espirulina* (tomamos como valor teórico el 64,7%; resultante de analizar dicha muestra por el método Kjeldhal), el 13% corresponde a proteína ficocianina.

#### 4.2.2) Extracción del resto de proteínas

Una vez finalizado el proceso anterior, se procedió a la extracción del resto de proteínas presentes en la muestra de *Espirulina* sin ficocianina obtenida. Esta técnica se realizó dos veces, trabajando con tres réplicas en cada ocasión, y se llevó a cabo a 25°C, temperatura a la que se obtenía mayor rendimiento según los resultados del apartado 4.1.

En cada caso se calculó la cantidad de proteína que, teóricamente, contenía la muestra de *Espirulina* pesada inicialmente. Dicha microalga tiene un contenido total de proteína del 64,7% (valor teórico), pero debemos tener en cuenta que, de ese porcentaje, el 13% corresponde, tal y como hemos calculado, a la proteína C-ficocianina, la cual ya hemos extraído. Por tanto, nos quedará un porcentaje teórico de proteína del 51,7% (64,7%-13%), que es el que utilizaremos para llevar a cabo los cálculos. Al finalizar el proceso, se pesó el extracto proteico obtenido, se analizó su pureza (porcentaje de proteína del mismo), y se calculó en último lugar el rendimiento de extracción de proteína logrado.

Cálculos realizados:

- Proteína teórica (g) = Peso total inicial de muestra (g) \* 0,517

- Pureza (%) = Porcentaje de proteína en el extracto obtenido, calculado utilizando el método Kjeldhal.

$$\bullet \text{ Rendimiento de extracción (\%)} = \left( \frac{\text{Peso extracto (g)} * \frac{\text{Pureza (\%)}}{100}}{\text{Proteína teórica (g)}} \right) * 100$$

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 13 y 14:

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen H2O (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 51,7 %		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	0,5045	10	1,5178	0,7847	pH 4,2	0,6397	77,00	62,77
1.2	0,5060	10						
1.3	0,5073	10						

**Tabla 13: Resultados proceso extracción de proteína a 25°C (primera vez)**

ID	Peso muestra (g)	Extracción			Precipitación	Extracto seco proteína		
		Volumen H2O (mL)	Peso total inicial (g)	Proteína teórica (g) 51,7 %		Peso extracto proteico obtenido (g)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1.1	0,5076	10	1,5230	0,7874	pH 4,2	0,6049	75,00	57,62
1.2	0,5029	10						
1.3	0,5125	10						

**Tabla 14: Resultados proceso extracción de proteína a 25°C (segunda vez)**

#### ➤ Resumen de resultados

Los resultados obtenidos han sido tratados estadísticamente, como se puede ver en las tablas 15 y 16:

Extracción proteína Espirulina	Rendimiento de extracción %				
	1	2	Promedio	Desvest	CV
	62,77	57,62	60,19	3,64	6,05

**Tabla 15: Resultados de rendimiento de extracción obtenidos**

Extracción proteína Espirulina	Pureza %				
	1	2	Promedio	Desvest	CV
	77,00	75,00	76,00	1,41	1,86

**Tabla 16: Resultados de pureza de los extractos obtenidos**

En vista de los resultados alcanzados, vemos que, al aplicar este método de extracción de proteína sobre una muestra de microalga *Espirulina* sin ficocianina, obtenemos extractos con una pureza de un 76%, logrando además un rendimiento de extracción de en torno al 60%. Si nos fijamos en la tabla 17, estos valores son muy parecidos, a simple vista, a los obtenidos para una muestra de cáñamo, cuando trabajamos a 25 °C de temperatura.

	Cáñamo (Tª = 25°C)		Microalga Espirulina sin ficocianina	
	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)	Pureza (%)	Rendimiento de extracción (%)
1	72,00	57,16	77,00	62,77
2	77,00	63,78	75,00	57,62
PROMEDIO	74,50	60,47	76,00	60,19
DESVEST	3,54	4,68	1,41	3,64
CV	4,75	7,74	1,86	6,05

Tabla 17: Comparación resultados obtenidos para las dos muestras vegetales, a 25°C

Llegados a este punto, aplicamos la herramienta estadística de análisis de datos “t de student” con el objeto de comparar los resultados de pureza y rendimiento de extracción obtenidos para los dos tipos de muestra, lo que nos permitirá decidir si dichos resultados se pueden considerar, o no, estadísticamente iguales. Los datos alcanzados se muestran en las tablas 18 y 19.

#### Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Cáñamo	Espirulina
Media	74,5000	76,0000
Varianza	12,5000	2,0000
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Valor experimental de t	-0,4286	
P(T<=t) una cola	0,3711	
Valor crítico de t (una cola)	6,3138	
P(T<=t) dos colas	0,7422	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062	

Tabla 18: Comparación de los resultados de pureza obtenidos para los dos tipos de muestras

#### Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Cáñamo	Espirulina
Media	60,4681	60,1945
Varianza	21,9198	13,2815
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Valor experimental de t	0,0465	
P(T<=t) una cola	0,4852	
Valor crítico de t (una cola)	6,3138	
P(T<=t) dos colas	0,9704	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062	

Tabla 19: Comparación de los resultados de rendimiento de extracción obtenidos para los dos tipos de muestras

Como vemos, el valor de  $t$  experimental es menor que el de  $t$  crítico en ambos casos, lo que nos lleva a determinar que, estadísticamente, **no hay diferencias significativas** entre los resultados obtenidos por los dos tipos de muestra vegetal, a una temperatura de 25°C. En consecuencia, concluimos que, tanto al utilizar muestra de cáñamo como de Espirulina, hemos llegado a alcanzar el mismo nivel de pureza y de rendimiento de extracción de proteína.

### 4.3 Digestibilidad de muestra de microalga Espirulina

El cálculo de la digestibilidad in vitro de las proteínas (IVPD, *in vitro protein digestibility*), se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IVPD (\%)} = [(P_d - P_b) / P_i] * 100$$

Donde  $P_d$  es la cantidad de proteína de la muestra digerida;  $P_b$  es la cantidad de proteína del blanco digerido; y  $P_i$  es la cantidad de proteína que contenía la muestra inicialmente, antes de ser digerida. Todo ello en gramos de proteína/gramo de muestra.

El papel que juega la disolución de blanco en este proceso es fundamental, puesto que nos permite descartar el contenido de nitrógeno procedente de las enzimas empleadas durante la digestión (pepsina y pancreatina).

En nuestro estudio hemos aplicado la técnica de digestibilidad sobre una muestra de microalga Espirulina desgrasada, cuyo contenido teórico de proteína es del 64,7%. Se han realizado 3 réplicas por muestra y por blanco, y éstos fueron los resultados obtenidos (tabla 20):

	Proteína inicial en la muestra (g proteína/g de muestra) $P_i$	Proteína en la muestra digerida (g proteína/g de muestra) $P_d$	Proteína en el blanco digerido (g proteína/g de muestra) $P_b$	IVPD (%)
<b>1.1</b>	0,6470	0,6313	0,3185	56,55
<b>1.2</b>	0,6470	0,6298	0,2123	56,32
<b>1.3</b>	0,6470	0,6345	0,2654	57,06
<b>Promedio</b>	<b>0,6470</b>	<b>0,6319</b>	<b>0,2654</b>	<b>56,64</b>
<b>Desvest</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,0531</b>	<b>0,38</b>
<b>CV</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,3872</b>	<b>20,0000</b>	<b>0,67</b>

Tabla 20: Resultados de digestibilidad obtenidos

Es decir, la cantidad de proteína que contenía la muestra digerida, una vez descontado el blanco, representa el 56,64% con respecto a la cantidad de proteína que teníamos inicialmente en la muestra. Dicho de otra manera, se ha conseguido digerir el 56,64% de la cantidad de proteína inicial.

En bibliografía pudimos comprobar cómo, en diferentes artículos sobre la Espirulina, hablaban de una digestibilidad de en torno al 60%, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro caso.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha conseguido desarrollar un método de obtención de extractos ricos en proteína a partir de dos fuentes de proteína vegetal: un subproducto de cáñamo y la microalga *Espirulina*.

El proceso de extracción de proteína del subproducto de cáñamo se ha llevado a cabo a cuatro temperaturas distintas, analizando los resultados de rendimiento de extracción y de porcentaje de pureza de los extractos obtenidos para cada una. Se ha concluido que, la temperatura a la que se realiza el método de extracción, influye en dichos resultados, al demostrar estadísticamente que son diferentes entre sí.

Por otra parte, el proceso de extracción de proteínas de la muestra de microalga *Espirulina* ha sido realizado a 25°C, temperatura optimizada para el cáñamo; y se han obtenido resultados, tanto de rendimiento de extracción como de porcentaje de pureza de los extractos, estadísticamente iguales a los alcanzados para la muestra del subproducto de cáñamo, a esa misma temperatura.

Otra de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo ha sido la de extracción de la C-ficocianina, un tipo de proteína que participa en el proceso de captación de la luz durante la fotosíntesis, de una muestra de microalga *Espirulina*, para conocer el porcentaje presente de la citada proteína en su composición. Los resultados obtenidos nos indican un porcentaje del 13% de ficocianina en dicha muestra de *Espirulina*.

Por último, se ha hecho un estudio de la digestibilidad de las proteínas presentes en una muestra de *Espirulina*, con el fin de analizar su grado de absorción en la dieta. Al aplicar el método descrito, se ha alcanzado un porcentaje de digestibilidad de un 57%, que corresponde con la proporción de proteína digerida en la muestra, con respecto a la que contenía inicialmente. Dicho porcentaje de digestibilidad obtenido está dentro de los niveles de digestibilidad encontrados en bibliografía para este tipo de proteínas.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Massia, A., Reinaldo, C., Vieira, J. (2018). "High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, 187-194.
- [2] Pojic, M., Misan, A., Tiwari, B. (2018). "Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin", *Trends in Food Science and Technology*, 75, 93-104.
- [3] Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., Wang, Y., Du, S. (2018). "Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal", *Food Chemistry*, 240, 856-862.
- [4] Silva, A., Moreira, L., Teixeira, W., Farias, W., Valdez, M., Karine, A. (2017). "Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 2101-2106.
- [5] Nadathur, S., Wanasundara, J., Scanlin, L. (2017). "Proteins in the Diet: Challenges in Feeding the Global Population", *Sustainable Protein Sources*, 1, 1-19.
- [6] Tamayo, A., Kyriakopoulou, K., Suarez, E., Berg, C., Janvan, A. (2018). "Understanding differences in protein fractionation from conventional crops, and herbaceous and aquatic biomass - Consequences for industrial use", *Trends in Food Science and Technology*, 71, 235-245.
- [7] Bao, J., Zhang, X., Zheng, J., Ren, D., Lu, J. (2018). "Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization", *Food Chemistry*, 264, 64-72.
- [8] Rodríguez, E., Steffolani, M., Martínez, C., León, A. (2014). "Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta", *Food Science and Technology*, 30, 1-7.
- [9] Moraes, C., Sala, L., Cerveira, G., Kalil, S. (2011). "C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 45-49.
- [10] Moreno, L. (2016). "Estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina", Trabajo Fin de Grado, Universidad de Almería.
- [11] Costa, C., Fernandes, J., Juliano, S. (2008). "C-Phycocyanin extraction process for large-scale use", *Journal of Food Biochemistry*, 34, 133-148.
- [12] Silveira, S., Burkert, J., Costa, J., Burkert, C., Kalil, S. (2007). "Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina Platensis* using factorial design", *Bioresource Technology*, 98, 1629-1634.

- [13] Safi, C., Ursu, A., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., Vaca-García, C. (2014). "Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods", *Algal Research*, 3, 61-65.
- [14] De Sousa, A., Marqués, L., Teixeira, W., Lobo, W., Valderez, M., Karine, A. (2017). "Extraction of Biomolecules from *Spirulina platensis* using Non-Conventional Processes and Harmless Solvents", *Environmental Chemical Engineering*, 17, 2-4.
- [15] [www.biocultura.org/uploads/NUTRIOPS\\_FINAL.pdf](http://www.biocultura.org/uploads/NUTRIOPS_FINAL.pdf)
- [16] House, J., Neufeld, J., Leson, G. (2010). "Evaluating the Quality of Protein from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Products Through the use of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11801-11807.
- [17] Teh, S., Bekhit, E., Carne, A., Birch, J. (2013). "Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates", *Food Measure*, 72, 34-41.
- [18] Kose, A., Ozen, M., Elibol, M., Oncel, M. (2017). "Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Spirulina platensis* as a nutritional supplement", *Biotech*, 3, 1-7.
- [19] Couto, C., Guerra, M., Reis, B., Silveira, T., Conte, C. (2015). "In vitro digestibility of commercial whey protein supplements", *Food Science and Technology*, 61, 7-11.